

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-98384

⑬ Int. Cl.

C 12 N 11/08

識別記号

府内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)4月28日

7329-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

## ⑮ 発明の名称 酵素の固定化方法

⑯ 特願 昭61-242829

⑯ 出願 昭61(1986)10月13日

⑰ 発明者 陶山 勝彦 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

⑰ 発明者 蔽下 安紀 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

⑰ 発明者 小山 正直 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

⑰ 出願人 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

明 索田

許請求の範囲第1項記載の方法。

## 1. 発明の名称

酵素の固定化方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) ポリウレタンを、ポリウレタンと酵素のいずれとも反応しうる官能基を有する高分子化合物を含む溶液で処理したのち、酵素溶液で処理することによりポリウレタンに酵素を固定化するに際し、該高分子化合物を含む溶液で処理する前にポリウレタンをあらかじめ50～100℃の热水で処理することを特徴とするポリウレタンに酵素を固定化する方法。

(2) 酵素が線維素溶解活性酵素である特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 線維素溶解活性酵素がウロキナーゼである特許請求の範囲第2項記載の方法。

(4) ポリウレタンと酵素のいずれとも反応しうる官能基を有する高分子化合物が無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体である特

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

本発明は、酵素の固定化方法に関するものであり、更に詳しくはポリウレタンに酵素を固定化する場合の改良された方法に関するものである。

## (従来の技術)

一般に酵素反応は、酵素を水に溶解した状態で行われるが、近年酵素の回収、再使用、酵素の安定化、酵素反応の連続化などを目的として酵素を水に不溶な固体表面に結合し(酵素の固定化)、酵素を固体触媒化した状態で用いることが行われるようになり、種々の方面において利用されてきている。

なかでも線維素溶解活性酵素を担体表面に固定化した材料は、抗血栓性材料として医療用材料分野においては、非常に有用な材料となっている。すなわち、血液にとって異物である物質が血液と接触すると、血液凝固反応が起こり、最終的にいわゆる血栓塊を形成する。この血栓形成反応は生

体にとっては非常に巧妙に仕組まれた自己防衛反応なのであるが、生体への異物挿入ということが病気の治療や診断を目的としてなされた場合、この血栓形成により治療や診断という本来の目的が果たせなくなるばかりでなく、かえって新たな合併症を作り出したり、場合によっては血栓が原因で死に至ることさえあるのである。

しかし近年の医療の進歩にともない生体にとって異物である材料を生体に挿入するということはますます多くなりつつあり、それだけ抗血栓性材料に対する要求も強くなっている。

一方、ポリウレタンは優れた物性、化学的安定を有することにより多方面において使用されている材料である。その意味でポリウレタンに酵素を固定化した材料は酵素の触媒作用を期待することができるばかりでなく、その素材が有する優れた物性を利用することができる点において大きな意義がある。

酵素を担体へ固定化する方法は、すでに多くの方法が提案され、ポリウレタンに酵素を固定化す

る方法もすでに提案されている。例えば、特公昭59-50337号公報にはポリウレタンに酵素を固定化するに際して、ポリウレタンの末端基を利用して、直接酵素をポリウレタンに共有結合的あるいはイオン結合的に固定化するか、又はポリウレタンの末端基をアミノ基、カルボキシル基、酸無水物基、酸クロリド基、アジド基などの反応性に富む官能基に変えたのちこれらの官能基を利用して、酵素を固定化する方法が提案されている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかし、上記のような従来法では酵素の固定化量の十分大きいものを得ることが困難であるという問題点を有していた。

酵素の固定化量は一般に多ければ多いほど大きい触媒作用を期待することができて有用である。酵素の固定化量を多くするためには、例えば、前記特公昭59-50337号公報の場合のごとく末端基を利用するときは、その末端基を増加させることにより酵素の固定化を増大させることができる。しかし、末端基を増加させることは、分子量

- 3 -

- 4 -

を低下させることであり、ポリウレタン素材の有する優れた物性も損なわれてしまう。

したがって、ポリウレタン素材の有する優れた物性も損なうことなく、かつ容易な方法でポリウレタンに、より多くの酵素を固定化する方法が望まれていた。

本発明はポリウレタン素材の有する優れた物性を損なうことなく、かつ容易な方法で多くの酵素を固定化する方法を提供することを目的とするものである。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上記のごとき問題点を解決するために鋭意検討の結果、ポリウレタンを热水で前処理することによってこのような目的を達成しうることを見出し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は、ポリウレタンを、ポリウレタンと酵素のいずれとも反応しうる官能基を有する高分子化合物を含む溶液で処理したのち、酵素溶液で処理することによりポリウレタンに酵素を固定化するに際し、該高分子化合物を含む溶液

で処理する前にポリウレタンをあらかじめ 50~100 °C の热水で処理することを特徴とするポリウレタンに酵素を固定化する方法を要旨とするものである。

本発明においてポリウレタンとは、主鎖の繰り返し単位中にウレタン結合を有する高分子化合物のことであり、工業的には主としてポリイソシアネートとポリオールとの重付加反応により製造される。ポリイソシアネートとしては、例えばトルエンジイソシアネート、キシレンジイソシアネート、ナフタレンジイソシアネート、ジフェニルメタンジイソシアネート、ジクロヘキシルメタンジイソシアネート、フェニレンジイソシアネート、エチレンジイソシアネート、シクロヘキシレンジイソシアネート、トリフェニルメタントリイソシアネート、トルエントリイソシアネートなどがあげられる。ポリオールとしては、例えばエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、ジエチレングリコール、シクロヘキサンジグリコールなどのポリオール、ポリエチレンオ

- 5 -

- 6 -

キシドグリコール、ポリプロピレンオキシドグリコール、ポリテトラメチレンオキシドグリコール、ポリエチレンオキシドーポリプロピレンオキシドグリコールなどのポリエーテルポリオールなどがあげられる。また、ポリオールとしては例えばコハク酸、グルタル酸、アジピン酸、セバシン酸、イソフタル酸、テレフタル酸、フタル酸などのジカルボン酸とエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコールとの縮合によって得られる両末端に水酸基を有するポリエステルをあげることもできる。さらに、これらポリオールの一部をポリアミン、ポリチオール、ポリカルボン酸などの他の活性水素化合物に置き換えたものであってもよい。これらのポリウレタンは目的に応じてチューブ、フィルム、シート、繊維などの形態を有する。また、ポリウレタン以外の材質からなる成形体表面にポリウレタンの皮膜を形成させたものであってもよい。

また、本発明において用いられる酵素としては、例えばアルコール脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、

グルコース-6-磷酸脱水素酵素、グルコースオキシターゼ、ルシフェラーゼ、L-アミノ酸オキシターゼ、カタラーゼ、チロシナーゼ、バーオキシターゼ等の酸化還元酵素、ヘキソナーゼ、ビルピン酸脱水酵素、カルバメートキナーゼ、アセテートキナーゼ、リボヌクレアーゼなどのトランスフェラーゼ、リバーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、ステロイドエステラーゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、デクストラナーゼ、インペルターゼ、ペプシン、レニン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、フィシン、トロンピン、カリクレイン、ストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミン、ブリノラーゼ、アスバラキナーゼ、ウレアーゼ、ベニシリニアミダーゼ、アピラーゼなどの加水分解酵素、ビルピン酸デカルボキシラーゼ、アルバルターゼ、スレオニンデアミナーゼなどのリアーゼ、グルコースイソメラーゼなどのイソメラーゼ、チロシル-T RNAシンセターゼ、アセチル-CoAシンセターゼなどのリガーゼなどが代表的なものとして

- 7 -

- 8 -

あげられる。これらのうち、特にストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミン、ブリノラーゼなどのいわゆる線維素溶解活性酵素は、抗血栓性材料を製造する上において有用性が高い。

また、本発明においてポリウレタンと酵素のいずれとも反応しうる官能基を有する高分子化合物とは、ポリウレタンの末端基であるイソシアナート基、アミノ基、水酸基などや、酵素のアミノ基カルボキシル基などと反応することのできる官能基を有する高分子化合物を意味し、好ましい具体例としては酸無水物基を有する高分子化合物、例えば無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体、エチレン-無水マレイン酸共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体など、ホルミル(アルデヒド)基を有する高分子化合物、例えばアクリレインの重合体、ジアルデヒドでんぶん、酸クロリド基を有する高分子化合物、例えばメタアクリル酸クロリドの重合体、エボキシ基を有する高分子化合物、例えばグリシジル(メタ)アク

リレート、あるいはイソシアナート基を有する高分子化合物などをあげることができる。これらの無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体は取扱の容易さ、安全性、反応性などの点で、特に医療用材料分野に用いる場合には好ましい。

本発明においては、ポリウレタンを上記のように高分子化合物を含む溶液で処理する前に、ポリウレタンの热水処理を行うことが必要である。

ポリウレタンの热水処理は、ポリウレタンを热水に接触させて行われ、より具体的には、例えば単に热水中に浸漬する、攪拌下に热水中に浸漬する、さらには通水下に热水中に浸漬するなどの方法を採用することができる。热水の中には、必要に応じてポリウレタンの物性を損なうことのない他の物質、例えば塩類、有機溶媒、界面活性剤などが含まれていてもよい。热水の温度は50～100℃、好ましいくは65～80℃である。热水処理を行う時間は特に限定されないが、一般的に言って热水の温度が低い場合には処理時間は長く、热水の温度が高い場合には処理時間は短く

- 9 -

- 10 -

てよい。例えば、100℃に近い温度であれば1～5時間程度、50℃に近い温度であれば10時間以上が好ましいが、これらの処理時間は実験的に容易に決定できるのでその中から最も経済的な条件を選んで設定することができる。

本発明においては、热水処理を行った後、上記高分子化合物を含む溶液による処理を行う。この処理のための溶液としては、上記高分子化合物を、好ましくは0.001～1.0wt%程度、とくに好ましくは0.01～5wt%程度の温度で不活性溶媒（この高分子化合物を溶解するが反応性官能基とは反応しない溶媒）、例えばアセトン、メチルエチルケトン、ベンゼン、トルエンあるいはこれらの混合溶媒などに溶解した溶液を用いることができる。この場合における処理とは、ポリウレタンとかかる溶液とを接触させることで行われ、単なる浸漬処理、攪拌下での浸漬処理、通液下での浸漬処理などいずれの方法でも行うことができる。処理を行う温度、時間は、特に限定されないが、好ましくはこれらの溶液の沸点以下の温度で、好ましく

は1分以上処理を行うことにより目的を達成することができる。

本発明においては、次いで酵素溶液で処理を行うことにより酵素の固定化を行う。固定化処理のための酵素溶液は、好ましくは酵素を水あるいは生理食塩水などに溶かした溶液として使用される。酵素溶液中には必要に応じて安定剤などを含んでいてもよく、また酵素溶液で処理を行うに際しての温度、時間の条件は、好ましくは常温以下の温度、好ましくは1時間以上である。

#### （実施例）

以下実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。

なお、例中、線維素溶解活性は金井、金井編著「臨床検査法提要」改訂増補25版（金原出版）V1-105を参照し、人ファブリノーゲン水溶液にトロンビン生理食塩水溶液を添加して作成したファブリノーゲン平板に試料を置き、37℃24時間放置後試料の周囲に溶解されたファブリノーゲン平板の溶解窓の面積を長径×短径 (mm<sup>2</sup>)で表すことによ

- 11 -

- 12 -

り測定した。

#### 実施例1、比較例1

4,4'-ジシクロヘキシルメタンジイソシアネート、ポリテトラメチレンエーテルグリコール及びテトラメチレングリコールを重合することによって得られたエーテル型脂環式ポリウレタン（Thermedix社、Tecoflex）から成形された外径1.6mm、内径1.2mmのチューブを65℃に加熱された蒸溜水中に24時間浸漬した。処理を行ったチューブを真空乾燥により水分を除去したのち、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体（GAF社、GANTREZ AN139）4wt%を含有する脱水アセトン溶液中に1時間浸漬した。その後、アセトンで十分洗浄を行い、真空乾燥によりアセトンを除去した。ついで、このチューブを、1/10M酢酸バッファーが10vol%添加され、ウロキナーゼが処理面積当たり130unit/cmとなるように調液されたウロキナーゼ生理食塩水溶液中に浸漬し、7℃で48時間放置した。処理後のチューブは蒸溜水で繰り返し洗浄を行ったのち、24

時間真空に引くことにより乾燥を行った。

得られたチューブを長さ2mmに切断し、その線維素溶解活性を測定したところ、ファブリノーゲン平板の溶解面積は484mm<sup>2</sup>であった。

比較のため热水処理を行わなかった以外は、実施例1と全く同じ操作をすることによって作成したチューブの線維素溶解活性は225mm<sup>2</sup>と低い値であった。

#### 実施例2、比較例2

4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネート、ポリテトラメチレンエーテルグリコール及びテトラメチレングリコールを重合することによって得られたエーテル型芳香族ポリウレタン（化成アツアジション社、ペレセン）から成形された外径1.6mm、内径1.2mmのチューブを、80℃の热水中に6時間浸漬した。

热水処理を行ったチューブは真空乾燥により水分を除去したのち、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体（GAF社、GANTREZ AN139）4wt%を含有する脱水アセトン溶液中に1時間浸

- 13 -

- 14 -

漬した。その後、アセトンで十分洗浄を行い、真空乾燥によりアセトンを除去した。ついで、このチューブを、1/10M酢酸バツファーが10vol%添加され、ウロキナーゼが処理面積当たり130unit/cmとなるように調液されたウロキナーゼ生理食塩水溶液中に浸漬し、7°Cで48時間放置した。処理後のチューブは蒸溜水で繰り返し洗浄を行ったのち24時間真空に引くことにより乾燥を行った。

得られたチューブを長さ2mmに切断し、その線維素溶解活性を測定したところ、フィブリン平板の溶解面積は506mm<sup>2</sup>であった。

比較のため热水処理を行わなかった以外は、全く同じ操作をすることによって作成したチューブの線維素溶解活性は210mm<sup>2</sup>と低い値であった。  
実施例3～9、比較例3

実施例1で用いたものと同じチューブについて、热水処理条件を表1の示すとく変えて処理を行った。処理後、実施例1と同様にしてウロキナーゼの固定化を行った。

- 15 -

長剤としてエチレンジアミンを使用して重合を行ってポリウレタンを得た。

得られたポリウレタンから厚さ約0.2mmのポリウレタンシートを形成し、ついでこのシートを80°Cの热水中に6時間浸漬した。

热水処理を行ったシートは真空乾燥により水分を除去したのち、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体(GAF社、GANTREZ AN139)1wt%を含有する脱水アセトン溶液中に0.5時間浸漬した。その後、アセトンで十分洗浄を行い、真空乾燥によりアセトンを除去した。ついで、このシートを、1/10M酢酸バツファーが10vol%添加され、ウロキナーゼが処理面積当たり100unit/cmとなるように調液された、ウロキナーゼ生理食塩水溶液中に浸漬し、20°Cで24時間放置した。処理後のシートは蒸溜水で繰り返し洗浄を行ったのち、24時間真空に引くことにより乾燥を行った。

得られたシート直径5mmの円形に切断し、その線維素溶解活性を測定したところ、フィブリン平

得られたチューブの線維素溶解活性は表1に示すとおりであった。表1から明らかのように、40°Cという低い温度においては長時間処理を行っても効果は認められなかった。

表 1

	処理温度(°C)	処理時間(h)	線溶活性(mm <sup>2</sup> )
実施例3	100	6	576
〃4	80	12	570
〃5	80	6	552
〃6	80	3	529
〃7	70	6	483
〃8	60	6	366
〃9	50	48	291
比較例3	40	72	226

#### 実施例10、比較例4

4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネートとポリテトラメチレンエーテルグリコールとを重合することによって得た両末端がイソシアネート基である芳香族ポリウレタンオリゴマーを、鎖延

- 16 -

板の溶解面積は460mm<sup>2</sup>であった。

比較のため热水処理を行わなかった以外は、実施例10と全く同じ操作をすることによって作成したシートの線維素溶解活性は175mm<sup>2</sup>と低い値であった。

#### (発明の効果)

本発明によれば、容易に、より多くの酵素をポリウレタンに固定化することが可能である。

本発明によって酵素の固定化されたポリウレタンはポリウレタン本来の優れた物性を損なうことなく有し、しかも酵素の触媒作用も大きい材料である。そして、とくにストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーター、プラスミン、ブリノラーゼなどのいわゆる線維素溶解活性酵素の固定化されたポリウレタンは、抗血栓性材料として血管内留置カテーテル、排液用ドレーンチューブ、バイパスチューブなどの医療用材料として極めて有用である。

特許出願人 ユニチカ株式会社

- 17 -

- 18 -